

Brief English Description of German Patent Application Number DE 196 08 963 A1

The analyte ionisation involves desorbing the analyte substances, which are mixed with decomposable substances i.e. matrix substances in solid form on a solid support (7), into a gas stream, via irradiation by a laser (21) at atmospheric pressure, and adding sufficient ions from a source (1-4) to chemically ionise the substance. The decomposable matrix substance is pref. an explosive e.g. cellulose tri-nitrate or trinitrotoluene (TNT). The ionised substance is then passed through a capillary (11) and ion guide (16) to a mass spectrometer (19,20).

⑩ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift

⑩ DE 196 08 963 A 1

⑪ Int. Cl. 6:

H 01 J 49/10

G 01 N 27/62

DE 196 08 963 A 1

⑪ Aktenzeichen: 196 08 983.8
⑪ Anmeldetag: 8. 3. 96
⑪ Offenlegungstag: 2. 10. 96

⑩ Innere Priorität: ⑪ ⑬ ⑯

28.03.95 DE 195113365

⑦ Anmelder:

Bruker-Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

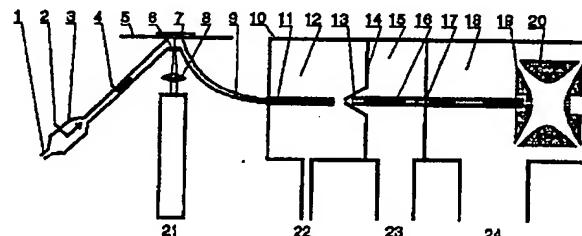
⑦ Erfinder:

Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE; Köster, Claus, 28885 Lillenthal, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑩ Verfahren zur Ionisierung schwerer Moleküle bei Atmosphärendruck

⑤ Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Ionisierung von schweren Substanzmolekülen, die sich rein oder mit anderen Substanzen vermischt in fester Form oder als Flüssigkeitsfilm auf einem festen Träger befinden. Die Erfindung besteht darin, die Substanzmoleküle durch molekülhaltende Desorption bei Atmosphärendruck in einen Gasstrom zu bringen, in dem sich genügend Ionen oder thermische Elektronen befinden, so daß die großen Moleküle durch Protonentransfer (APCI - atmospheric pressure chemical ionization), Elektronentransfer (CE - charge exchange), oder Elektroneneinfang (EC - electron capture) ionisiert werden. Die Desorption kann durch einen Laserstrahl bewirkt werden. Bei Benutzung zersetzungsfähiger Matrixsubstanzen, in denen die großen Moleküle eingebettet sind, kann sie aber auch durch photolytische, thermolytische oder chemolytische Prozesse erzwungen werden.



DE 196 08 963 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESPATENTBLATT 00 00 000 000/000

0000

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Ionisierung von schweren, nichtverdampfbaren Substanzenmolekülen bei Atmosphärendruck. Die Erfindung besteht darin, die Substanzmoleküle durch eine sich explosiv selbstzersetzende Matrix, deren Zersetzung durch Laserlicht initiiert wird, in das Umgebungsgas zu bringen und die Analytmoleküle anschließend durch Ionisierung bei Atmosphärendruck zu ionisieren (API = atmospheric pressure ionization). Explosivstoffe bilden eine besonders günstige Gruppe der Matrixmaterialien.

Allgemeiner Stand der Technik

Das Interesse an der massenspektrometrischen Analyse großer Moleküle, vor allem großer Bio- oder Polymermoleküle, ist in den letzten Jahren beträchtlich gewachsen, und durch eine Reihe von Ionisierungsverfahren für diese Moleküle möglich geworden. In der Fachliteratur sind für diese Ionisierungsmethoden folgende Abkürzungen zu finden: SIMS (Sekundärionen-Massenspektrometrie), PD (Plasma Desorption), MALDI (Matrixunterstützte Laser-Desorption und -Ionisierung), FAB (Fast atom bombardment), LSIMS (liquid SIMS), ESI (Elektrosprüh-Ionisierung). Diese Ionisierungsarten sind dem Fachmann wohlbekannt.

Mit Ausnahme der Elektrosprüh-Ionisierung ist allen diesen Methoden gemeinsam, daß sie eine relativ geringe Ausbeute an Ionen haben. Von 10000 Substanzmolekülen wird nur etwa ein Ion gebildet. Der Erfolg dieser Methoden ist trotzdem sehr groß, da immerhin von einem Attomol Substanz (also von rund 600000 Molekülen) 60 Ionen gebildet werden können. Diese können im Prinzip in geeigneten Massenspektrometern ein Spektrum erzeugen, das für die Bestimmung des Molekulargewichtes ausreichen kann. In der Praxis erreicht man diese Empfindlichkeit noch nicht, es werden für diese Bestimmung in guten Flugzeitspektrometern immer noch mindestens 100 Attomol benötigt.

Für diese Methoden ist es aber nach wie vor nachteilig, daß die Probenträger umständlich über Vakuum-schleusen ins Vakuum gebracht werden müssen. In biochemischen Laboratorien ist eine solche Behandlung von Proben ungewohnt und fremd, es ist viel bequemer und gewohnter, Probenträger außerhalb des Vakuums zu belassen. Durch Probenträger, die ins Vakuum gebracht werden müssen, wird auch die Kopplung der Massenspektrometrie mit chromatographischen und elektrophoretischen Separationsverfahren erschwert.

Der große Erfolg der Elektrosprüh-Ionenquellen besteht daher zum Teil darin, daß die Ionisierung außerhalb des Massenspektrometers erfolgt. Sie werden in aller Regel bei normalem Atmosphärendruck angewendet. Die Ionen, die so erzeugt werden, können inzwischen relativ effektiv und ohne übergroße Verluste ins Vakuum eingeschleust und dem Massenspektrometer zugeführt werden. Dabei können je nach technischer Ausführung Überführungsausbeuten zwischen 0,1 bis 1% erreicht werden. Da die die vakuumbexterne Ionisierung nahe an 100% Ausbeute herankommt, sind die Sprühmethoden inzwischen sehr effektiv und den Ionisierungsmethoden im Vakuum um ein bis zwei Größenordnungen überlegen. Allerdings sind sie bisher mit höchster Empfindlichkeit nur bei speichernden Massenspektrometern (Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallen oder ICR-Massenspektrometer) einsetzbar.

Es lassen sich jedoch nicht alle Substanzen durch

Elektrosprüh-Verfahren ionisieren, und die Nachfrage an empfindlicheren Methoden der Ionisierung aus dem festen Zustand ist nach wie vor anhaltend groß. Das Bestreben geht beispielsweise dahin, die Eiweiße aus einer einzigen Zelle in situ analysieren zu können. Insbesondere aber lassen sich elektrophoretisch in Gel-Schichten zweidimensional getrennte Substanzen besser von Oberflächen herunter ionisieren, statt sie in aufwendigen Schritten einzeln aus dem Gel oder aus Blott-10 Membranen in eine Lösung zu extrahieren, die dann sprühbar wäre.

Aufgabe der Erfindung

15 Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zu finden, das große, unverdampfliche Moleküle, die sich auf einem festen Probenträger befinden, mit großer Effektivität vom festen Zustand in den Zustand ionisierter Einzelmoleküle überführt und einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich macht. Dabei soll die Ionenausbeute gegenüber heute üblichen Verfahren erhöht und der Umgang mit dem Probenträger vereinfacht werden.

Erfindungsgedanke

Dieses Ziel der Erfindung läßt sich am ehesten erreichen, wenn die Erzeugung von Ionen großmolekularer Substanzen, die bisher in Prozessen wie MALDI mit einer eher mäßigen Ausbeute im Vakuum stattfindet, in den Raum außerhalb des Vakuums verlegt wird. Dabei läßt sich der Ionisierungsprozeß, der bisher mit dem Desorptionsprozeß unlösbar verbunden war, von diesem trennen. Bei Atmosphärendruck läßt sich durch die bekannte Methode der Ionisierung bei Atmosphärendruck (API), insbesondere durch chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI), aber auch durch Landungstransfer (CE) oder durch Elektroneneinfang (EC), eine wesentlich höhere Ionisierungsausbeute in der Nähe von 100% erreichen, so daß trotz der Überführungsverluste ins Vakuum eine wesentlich erhöhte Ionenausbeute der Untersuchungssubstanz für die Analyse erreicht werden kann.

Diese externe Ionisierung wird möglich, weil in in jüngster Zeit Verfahren bekannt geworden sind, mit denen sich Ionen, die sich in einem Gas bei Atmosphärendruck befinden, sehr effektiv und preiswert einer massenspektrometrischen Analyse im Vakuum zuführen lassen. Die Einführung des Gases mit den Ionen ins Vakuum kann durch geeignete Kapillaren geschehen, wobei praktisch sehr hohe Überführungsausbeuten für die Ionen erreicht werden. Die Benutzung neu auf dem Markt befindlicher zweistufiger Turbomolekularpumpen mit zusätzlicher Dragstufe zur differentiellen Be-pumping solcher Einlaßsysteme macht die Ioneneinführung inzwischen relativ preiswert. Der sehr effektive Einfang und die Führung der Ionen in langgestreckten Multipolanordnungen zum Massenspektrometer haben dazu geführt, daß die extern erzeugten Ionen mit hohen Ausbeuten von bis zu 1% dem Massenspektrometer zugeführt werden können.

Das Problem ist dabei die zerstörungsfreie Überführung der nichtverdampfbaren Analytmoleküle vom Probenträger in das Umgebungsgas. Die Überführung muß sehr schnell sein, da sich sonst die Moleküle durch Energieaufnahme zersetzen. Die Analytmoleküle sollen weit in das Gas vor dem Probenträger transportiert werden, um eine Rückkondensation zu vermeiden. Es soll ande-

erseits nicht zu Clusterbildungen mit Matrixmaterial oder zu Kondensationen der Analytmoleküle kommen, die in Umgebungsgas sehr leicht auftreten.

Es ist daher ein Grundgedanke der Erfindung, den Desorptionsprozeß in das Umgebungsgas hinein durch eine sich photolytisch oder thermolytisch zersetzende Matrixsubstanz zu unterstützen. Die Zersetzung soll außerordentlich schnell erfolgen und nur leichte Gase zurücklassen. Die Gase sollen die schweren Moleküle in das Umgebungsgas hineinblasen.

Für diese Aufgabe eignen sich organische Explosivstoffe wie beispielsweise Zellulosetrinitrat, TNT, Pikrinsäure oder Xylit in besonderem Maße, aber auch metallorganische Stoffe wie Silberazid oder Bleiazid können Verwendung finden. Auch normalerweise nicht als Sprengstoffe verwendete Mittel wie beispielsweise Zellulosedinitrat (dient als Grundlage der Nitrolacke und verpufft bei Erwärmung) können verwendet werden. Die organischen Explosivstoffe zersetzen sich in die Gase Wasser, Kohlenmonoxid, Kohlendioxid und Stickstoff, es bleibt kein Rückstand. Sie können mit metallorganischen Zündmitteln (Bleiazid) versetzt werden, um die Zündtemperatur herabzusetzen. Der Zusatz von anderen leicht thermolytisch zersetzbaren, aber dabei Energie aufnehmenden organischen Materialien, wie beispielsweise einfachen Zuckern, kann zur Herabsetzung der Gastemperatur dienen.

Die Zersetzungsprozesse der Matrixmoleküle werden, wie schon in ähnlicher Weise beim Vakuum-MALDI-Prozeß bekannt, durch die Einstrahlung von Laserlicht initiiert. Dabei ist ein Pulslaser einem Dauerstrichlaser vorzuziehen, da die Zersetzung dann zu einer explosionsähnlichen Ausdehnung einer kleinen Wolke des Zersetzungsdampfes führt, und die großen Moleküle gasdynamisch mitgenommen werden, bevor sie sich wieder adsorptiv an den Untergrund binden können. Es ist aber auch eine Dauerstrich-Einstrahlung möglich, wenn eine gute Fokussierung vorliegt und Probenträger und Laserfokus relativ so zueinander bewegt werden, daß ständig frisches Matrixmaterial photo- oder thermolytisch zersetzt werden kann.

Diese molekülzerstörenden Prozesse sollen dabei nicht auf die Untersuchungsmoleküle selbst wirken. Dazu ist es besonders günstig, die Analytmoleküle nicht in die Matrix einzubetten, sondern auf der Oberfläche zu deponieren. Werden die Matrixsubstanzen so ausgesucht, daß ihre Zersetzungsprodukte im Normalzustand gasförmig sind, werden bei rapider Zersetzung der zugrundeliegenden Matrixschicht die aufgelagerten, großen Untersuchungsmoleküle wohl behalten in die Gasphase katapultiert.

Die meisten organischen Explosivstoffe sind nicht in Wasser, wohl aber in Azeton, löslich. Sie können daher (wie schon die Nitrolacke) sehr einfach als dünne Lackschicht auf den Probenträger aufgebracht werden. Die meisten dieser Stoffe sind zudem sehr adsorptiv, so daß große Analytmoleküle, die in wäßriger Lösung aufgebracht werden, sich an der Oberfläche adsorptiv binden. Es ist sogar möglich, Salze und andere Puffermittel, die den Lösungen zugegeben waren, ohne große Verluste an Analytmolekülen wieder wegzuwaschen.

Die Lackschichten können leicht so dünn gemacht werden, daß die explosive Zersetzung auf den vom Laserlicht bestrahlten Teil der Schicht beschränkt bleibt. Explosivstoffe lassen sich im allgemeinen leicht derivatisieren, ohne ihre Zersetzblichkeit zu verlieren. Damit können sie relativ leicht so verändert werden, daß sie das Licht der benutzten Laserwellenlänge absorbieren.

Anders als bei MALDI müssen bei der Desorption bei Atmosphärendruck die freiwerdenden zersetzen Matrixmoleküle nicht die Aufgabe übernehmen, die großen Analytmoleküle zu ionisieren. Die Auswahl der Matrixmoleküle richtet sich daher nur nach deren Fähigkeit zur desorptiven Befreiung der großen Moleküle. Im Gegensatz dazu mußte bei MALDI jeweils ein Kompromiß zwischen absorptiver Energieaufnahme der Matrix durch die Photonen, Verdampfbarkeit und Ionisierungsfähigkeit geschlossen werden, was dazu führte, daß bisher keine für alle Proteine, andere Biomoleküle und Polymere gemeinsam optimale Matrixsubstanz gefunden werden konnte. Es befinden sich viele verschiedene Matrixsubstanzen im Einsatz, und oft muß die optimale Matrixsubstanz von Fall zu Fall in langwierigen Schritten ermittelt werden.

Es ist daher Grundlage der Erfindung, in den hinein die großen Analytmoleküle katapultiv desorbiert werden, in an sich bekannter Weise Ionenmäßig großer Reaktantgasmoleküle zur positiven oder negativen Ionisierung der Analytmoleküle im Überschuß beizugeben (API = atmospheric pressure ionization).

Die Auswahl der chemisch ionisierenden Reaktantgasen richtet sich nach den Ionisierungsenergien der Biomoleküle. Die Reaktantgase müssen in dem Umgebungsgas stabile Ionen bilden, die leicht andere Substanzen durch Abgabe von Protonen ionisieren können, und ihre Ionisierungsenergie muß über der der zu ionisierenden großen Moleküle liegen, ansonsten ist der Auswahl überhaupt keine Grenze gesetzt.

Die Ionisierung der Reaktantgase kann in bekannter Weise geschehen, beispielsweise über eine Zelle mit einem Beta-Strahler, oder durch eine Corona-Entladung. Dabei hat es sich als zweckmäßig erwiesen, zunächst nur leicht feuchte Luft oder leicht feuchten Stickstoff durch den Beta-Strahler oder die Corona-Entladung zu ionisieren. Dabei wird zunächst der im Überschuß vorhandene Stickstoff ionisiert, wobei aber sehr rasch durch Ladungsaustausch Wasser-Ionen gebildet werden, die nach kurzer Wegstrecke des Gases ausschließlich vorhanden sind und dann die weitere Ionisierung übernehmen. Dem Strom dieses Gemisches aus Gasmolekülen und Wasser-Ionen wird dann das Reaktantgas in einer Konzentration von wenigen Prozenten beigemischt, worauf sehr schnell die Wasser-Ionen mit den Reaktantgas-Molekülen unter Bildung der Reaktantgas-Ionen reagieren, die dann aus energetischen Gründen ausschließlich übrigbleiben. Im Gegensatz zur normalen chemischen Ionisierung, für die vorzugsweise Methan, Äthan oder Isobutan verwendet werden, können hier bevorzugt schwerere Reaktantgase verwendet werden. Insbesondere hat sich für diesen Zweck Xylol bewährt, da es die großen Biomoleküle ionisiert, ohne eine Fragmentierung zu bewirken. Der Unterschied der Ionisierungsenergien zwischen Xylol und den großen Biomolekülen ist so gering, daß keine Überschußenergie zur Fragmentierung vorhanden ist. Andererseits liegt die Ionisierungsenergie des Xylols unter den Ionisierungsenergien von möglichen Verschmutzungen des Umgebungsgases, so daß Xylol als relativ universelles Reaktantgas angesehen werden kann. Es gibt aber eine große Zahl an Substanzen, die ähnlich günstig sind wie Xylol.

Die Ionisierungsausbeute an großen Analytmolekülen kann insbesondere dadurch gesteigert werden, daß die kleinen Reaktantgas-Ionen durch ein axial angeordnetes elektrisches Feld relativ zum strömenden Gas bewegt werden, ähnlich wie das in einem Ionen-Mobili-

täts-Spektrometer geschieht. Die Anzahl der Stöße der kleineren Reaktantgas-Ionen mit möglichst vielen strömenden Analytmolekülen wird dadurch erhöht, daß die Reaktantgas-Ionen das Gas regelrecht durchfließen.

Es ist eine weitere Grundidee der Erfindung, den Rest dieser mäßig großen Reaktantgasionen vor Erreichen des Massenspektrometers wieder auszufiltern. Das Ausfiltern kann in einfacher Weise im Vakuum mit den ionenführenden Multipolanordnungen geschehen, die eine untere Massen-Abschneidegrenze für den Einfang und die Weiterleitung von Ionen haben.

Es ist jedoch auch möglich, die überschüssigen Reaktantgas-Ionen bereits in der Eingangskapillare zum Massenspektrometer auszufiltern. Längs der Eingangskapillare wird normalerweise ein elektrisches Längsfeld angelegt. Die Ionen werden dann durch den Gasstrom viskos gegen dieses Feld mitgenommen und auf ein höheres Potential gehoben. Dabei bewegen sich die Ionen aufgrund ihrer Ionemobilität gegen den Gasstrom. Da sich leichte Ionen schneller bewegen als schwerere, existiert eine untere Transportgrenze für die Ionen. Leichtere Ionen können sich schneller bewegen als es der Gasgeschwindigkeit in der Kapillare entspricht, daher werden sie nicht in das Massenspektrometer transportiert. Durch den Einbau einer filternden Wegstrecke, längs der das elektrische Feld so groß ist, daß die Reaktantgasionen nicht transportiert werden können, können diese ausgefiltert werden. Diese Methode hat den Vorteil, daß die Raumladungsdichte in der Kapillare kleiner wird, und die schweren Analytmoleküle eine bessere Transportausbeute zeigen. Außerdem läßt sich zu Beginn dieser Filterstrecke eine besonders hohe Ausbeute für Analytionen erhalten.

Mit Molekülien kleinerer Reaktantgasmoleküle kann auch eine mehrfache Ionisierung der schweren Moleküle bewirkt werden.

Es ist auch möglich, dem Gasstrom negative Ionen oder thermische Elektronen beizugeben, um negative Ionen der großen Biomoleküle zu erzeugen. Diese Art der Ionenerzeugung ist besonders bei Nukleotiden von Bedeutung.

Weitere Vorteile der Erfindung

Photolytisch zersetzbare Matrixmoleküle können auch eine Kühlung der großen Moleküle und damit eine bessere Stabilität bewirken, wie es beispielsweise durch die Beimengung photolytisch zersetzbaren Zuckers als sogenannte „Ko-Matrix“ in bisherigen MALDI-Verfahren bekannt geworden ist. Die Kühlung im Gasstrom dient ebenfalls der weiteren Stabilisierung der großen Ionen.

Für bestimmte Arten von Massenspektometern ist es besonders vorteilhaft, daß die Ionen in der Eingangskapillare des Massenspektrometers gegen eine Potentialdifferenz angepumpt werden können. Sie können damit auf das Beschleunigungspotential dieser Massenspektrometer gehoben werden. Dieses Anpumpen gegen eine Potentialdifferenz ist automatisch mit einer Bewegung aller Ionen relativ zu den Neutralmolekülen des Gases verbunden, was sich wiederum günstig auf die Ionisierungsausbeute für große Moleküle auswirkt. Es ist nicht auszuschließen, daß dadurch sogar große Molekül-Ionen in die Mitte des Gasstrahls in der Kapillare fokussiert werden, wodurch die Überführungsausbeute erhöht wird.

Von besonderem Vorteil ist aber der leichte Umgang mit dem Probenträger außerhalb des Vakuums. Der

Probenträger muß nicht erst umständlich über eine Vakuumschleuse in das Vakuumsystem eingeschleust werden. In besonders günstiger Ausführungsform kann der Probenträger einfach auf eine kleine Bewegungsvorrichtung aufgelegt werden, das Massenspektrometer ist dann sofort zur Aufnahme der Spektren bereit.

Günstig ist auch die Möglichkeit zur zweidimensionalen Bewegung der Probenträger an Atmosphärendruck. Diese ist im Gegensatz zur Bewegung im Vakuum außerordentlich einfach und preiswert herzustellen. Eine Bewegung im Vakuum ist dagegen kompliziert und teuer, da die Antriebe außerhalb des Vakuums verbleiben müssen, und die Übertragung der Bewegungen über Bälge oder andere Übertragungsglieder vorgenommen werden muß. Außerdem ist die Verwendung von Schmiermitteln im Vakuum nicht möglich, so daß sehr teure selbstschmierende oder gleitende Materialien verwendet werden müssen.

Kurze Beschreibung der Bilder

Fig. 1 zeigt ein Schema einer bevorzugten Vorrichtung nach dieser Erfindung.

- (1) Ansaugöffnung für feuchte Luft,
- (2) Hochspannungsdurchführung und Nadel für die Corona-Entladung,
- (3) Ionisierungskammer für Luft,
- (4) Zuführung des Reaktantgases,
- (5) Arbeitsplatte mit Loch zum Auflegen der Probenträger (in einem nicht gezeigten beweglichen Rahmen),
- (6) Fenster für die Einstrahlung fokussierten Laserlichts,
- (7) Probenträger mit Untersuchungssubstanz auf der Unterseite, mit einer hier nicht gezeigten Bewegungsvorrichtung in zwei Dimensionen verschiebar,
- (8) Fokussierungslinse für das Laserlicht,
- (9) Zuführungskanal für das Gemisch aus Gas und Ionen zur Eingangskapillare,
- (10) Wand des Vakuumsystems für das Massenspektrometer,
- (11) Eingangskapillare, durch die das Gemisch in das differentielle Pumpensystem eingeführt wird,
- (12) erste Kammer des differentiellen Pumpensystems,
- (13) Gasabstreifer mit Durchgangsloch für die Ionen in der Wand zur nächsten Kammer der differentiellen Pumpenanordnung,
- (14) Wand zwischen erster und zweiter Kammer des differentiellen Pumpensystems,
- (15) zweite Kammer des differentiellen Pumpensystems,
- (16) Ionenleitvorrichtung aus einem langgestreckten Multipolfeld mit stabförmigen Polen,
- (17) Durchbruch in der Wand der zweiten Kammer zur Hauptvakuumkammer des Massenspektrometers,
- (18) Hauptvakuumkammer des Massenspektrometers,
- (19) Endkappe eines Massenspektrometers auf Basis einer Quadrupol-Hochfrequenz-Ionenfalle,
- (20) Ringelektrode der Ionenfalle,
- (21) Laser zur Desorption der Untersuchungssubstanz,
- (22) Pumpstutzen der ersten Kammer des differentiellen Pumpensystems,

(23) Pumpstutzen der zweiten Kammer,
 (24) Pumpstutzen der Hauptvakuumkammer des Massenspektrometers.

Fig. 2 zeigt eine Hexapolanordnung als Ionenleitvorrichtung. Die Polstäbe sind mit einer Hochfrequenzspannung beschickt, wobei sich die Phase jeweils zwischen benachbarten Stäben wechselt,

Fig. 3 zeigt eine gegenüber Fig. 1 leicht veränderte Anordnung mit einer Mischkammer (25), in der der Gasstrom mit den Probemolekülen durch einen Gasstrom mit den Reaktantgasionen umhüllt wird. Die Anordnung verhindert weitgehend Wandsöße der Probenmoleküle. Die Bedeutung der anderen Zahlen wie in Fig. 1.

Besonders günstige Ausführungsformen

Fig. 1 zeigt ein Schema einer bevorzugten Vorrichtung nach dieser Erfindung. Durch eine Öffnung (1) wird feuchte Luft in eine Ionisationskammer (3) gesaugt, in der sich an einer Nadel (2), die sich unter Hochspannung befindet, eine Corona-Entladung ausbildet. Die Corona-Entladung kann auch durch einen Beta-Strahler an der Wand der Ionisationskammer (3), beispielsweise Ni^{63} , ersetzt werden. Bei Benutzung von Ni^{63} sollte die Ionisierungskammer (3) einen Durchmesser von etwa 10 Millimetern haben, da die Elektronen des Ni^{63} einen Weg von etwa 6 Millimetern durchlaufen, bevor sie in Luft bei Atmosphärendruck ihre kinetische Energie verlieren und gestoppt werden. Am Ende ihres Weges bilden sie die meisten Ionen.

In der Ionisationskammer (3) werden zunächst ganz überwiegend Stickstoff-Ionen gebildet, die aber rasch mit Wassermolekülen H_2O zu Wasser-Ionen OH^+ und OH_2^+ reagieren. Durch weitere Reaktionen der Wasser-Ionen mit Wassermolekülen wird ein überwiegender Anteil an Ionen der Form OH_3^+ gebildet. Diese Ionen sind ganz besonders zu chemischer Ionisierung durch Abgabe eines Protons befähigt.

Dem strömenden Gas wird durch die Zuführung (4) ein niedrigerer Prozentsatz an Reaktantgas, beispielsweise Xylool, beigemischt. In kürzester Zeit werden die Xyloolmoleküle durch Protonierung durch die Wasser-Ionen zu energetisch viel günstigeren protonierten Xylool-Ionen verwandelt, wobei sich die Wasser-Ionen verzehren. Wenn der Gasstrom zum Loch in der Arbeitsplatte (5) gelangt, sind praktisch nur noch Xylool-Ionen vorhanden.

Auf der Arbeitsplatte (5) mit einem Loch liegt der Probenträger (7). Die Untersuchungssubstanz befindet sich in einer sehr dünnen Schicht auf der Unterseite der Trägerplatte (7), zusammen mit Matrixmolekülen. Der Probenträger liegt in einem nicht gezeigten Rahmen einer ebenfalls nicht gezeigten x-y-Bewegungsvorrichtung, der einen feinen Abstand zwischen Probenträger und Arbeitsplatte hält. Dadurch wird die Untersuchungssubstanz vor Berührungen mit der Arbeitsplatte geschützt. Durch den feinen Abstandsspalt wird — gewollt — aber auch etwas Umgebungsluft (oder Stickstoff) als Nebenstrom in den Gaskanal gezogen. Aus dem preiswerten Stickstoff-Laser (21) werden Lichtblitze mit 337 Nanometer Wellenlänge abgegeben, die durch die Linse (8) fokussiert durch das Fenster (6) und das Loch in der Arbeitsplatte (5) auf den Probenträger fallen und dort die Matrixmoleküle in explosionsartigen Verpuffungen verdampfen lassen. Dabei werden die Untersuchungsmoleküle mit in den Gasstrom desor-

bier. Sie werden durch den zusätzlichen Nebenstrom, der durch den feinen Abstandsspalt zwischen Träger- und Arbeitsplatte eindringt, mitgenommen und mit dem Gemisch aus Gas und Ionen vermischt.

Es kann die Probenträgerplatte auch aus einem transparenten Material wie beispielsweise Glas oder Kunststoff hergestellt werden. Es ist dann möglich, den Laser über der Platte anzurichten, und das Laserlicht durch die Probenträgerplatte hindurch zuzuführen. Diese Anordnung führt zu einer einfacheren Konstruktion.

Das Gemisch aus Luftmolekülen, Reaktantgas-Ionen, Matrixmolekülen und Molekülen der Untersuchungssubstanz wird nun über den Kanal (9) der Eingangskapillare (11) zugeführt, die durch die Wand (10) des Massenspektrometers ins Vakuum reicht. Die Eingangskapillare mit einem Innendurchmesser von 0,5 Millimetern und einer Länge von 10 bis 15 Zentimetern saugt dabei ein bis zwei Liter Luft pro Minute ins Vakuum. Dieser Saugstrom hält den Gasstrom durch die Ansaugöffnung (1) in die Ionisationskammer, den Nebenstrom durch den Spalt zwischen Arbeits- und Trägerplatte, und den Strom durch den Kanal (9) aufrecht, ohne daß es einer zusätzlichen Bepumpung bedarf. In dem Kanal (9) mit einem Durchmesser von etwa 1,5 Millimeter wird dabei eine in etwa laminare Strömung mit einer Zentralgeschwindigkeit von etwa 20 Metern pro Sekunde erreicht. Der Kanal (9) wird zweckmäßigerverweise konisch ausgeführt, um einen guten und turbulenzfreien Übergang in die Eingangskapillare (11) zu bieten.

Im wesentlichen werden nun die Untersuchungsmoleküle durch chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) im Kanal (9) ionisiert. Diese Ionisierung ist im allgemeinen sehr effektiv und kommt an 100% Ionenausbeute heran, wenn die Konzentration der Reaktantgasionen ausreichend hoch ist. Durch Wandstöße im Kanal (9) und in der Eingangskapillare (11) gehen allerdings etwa 90% der Ionen verloren, immerhin ist die Ausbeute sehr hoch. Der Kanal (9) soll daher so kurz wie möglich gehalten werden.

Bei niedrigen Konzentrationen an Reaktantgasionen ist es zur Erhöhung der Ionisierungsausbeute auch möglich, einen Teil des Kanals (9) durch Anbringen eines axial gerichteten elektrischen Feldes als Ionendriftstrecke auszubilden. Wird die Eingangskapillare (11) dazu benutzt, die Ionen genen ein elektrisches Potential anzuzapfen, so ist damit automatisch eine Erhöhung der Ausbeute an schweren Ionen gegeben.

In der ersten Kammer (12) der Differenzpumpeinrichtung, die durch den Stutzen (22) von einer Vorvakuum-pumpe bepumpt wird, werden die Ionen durch die adiabatische Expansion des Gases am Ende der Eingangskapillare beschleunigt und gleichzeitig gekühlt. Sie bilden einen kegelförmigen Strahl von etwa 20° Öffnungswinkel. Durch ein elektrisches Ziehfeld (nicht gezeigt) zum Gasabstreifer (13) hin kann ein beträchtlicher Teil der Ionen durch die Öffnung des Gasabstreifers (13), die etwa 1,2 Millimeter Durchmesser hat, in die zweite Kammer (15) des differentiellen Pumpsystems überführt werden. In der zweiten Kammer (15) werden die Ionen praktisch vollständig von der Ionenleitvorrichtung (16), die aus langgestreckten Polstäben besteht und ein elektrisches Multipolfeld erzeugt, aufgenommen. Der Einfang der Ionen durch die Ionenleitvorrichtung wird dabei ganz wesentlich durch die gasdynamischen Prozesse im Gasabstreifer unterstützt. Diese Ionenleitvorrichtung führt die Ionen durch die Kammer (15), einen Wandausbruch (17), und die Hauptvakuumkammer (18) zum Massenspektrometer, das hier als Hochfrequenz-

Quadrupol-Ionenfalle mit Endkappen (19) und Ringelektrode (20) ausgebildet ist. Die Ionenleitvorrichtung ist vorzugsweise als Hexapolanordnung ausgebildet und besteht aus sechs etwa 15 Zentimeter langen Polstäben von je nur einem Millimeter Durchmesser (siehe Fig. 2), die durch nicht gezeigte Keramikhalter zueinander fixiert sind. Die dünnen Polstäbe sind auf dem Umfang eines Zylinders angeordnet und umschließen einen leeren Innenzyylinder von nur 2 Millimeter Durchmesser. Mit einer Hochfrequenzspannung von etwa 600 Volt bei 3,5 Megahertz hat dieser Multipol eine untere Abschneidegrenze für einfach geladenen Ionen bei etwa 150 atomaren Masseneinheiten. Damit haben die Ionen des Xylols, die protoniert nur 107 atomare Masseneinheiten schwer sind, innerhalb der Ionenleitvorrichtung keine stabilen Bahnen und werden ausgeschieden. Auch Ionen von Resten der Matrixmoleküle können so ausgeschieden werden, wenn ihr Molekulargewicht entsprechend klein ist. Nur die schweren Ionen der Untersuchungssubstanz können, wie erwünscht, das Massenspektrometer erreichen.

Fig. 3 zeigt eine gegenüber Fig. 1 leicht veränderte Anordnung. Die durch das Licht aus dem Laser (21) desorbierte Substanz wird hier zunächst durch den Nebenstrom mitgenommen, der durch den Spalt zwischen Arbeitsplatte (5) und Trägerplatte (7) eindringt. Das Nebengas umhüllt den Strom der Probenmoleküle und verhindert Wandstöße der Probenmoleküle. Der Strom aus Gas mit den Probenmolekülen wird erst in einer Mischkammer (25) mit dem Gasstrom umhüllt, der die Reaktantgasionen enthält. Diese dringen durch Diffusion in den zentralen Gasstrom ein und bewirken die chemische Ionisierung der Probenmoleküle.

Auch hier kann eine transparente Ausbildung der Probenträgerplatte die Konstruktion eines entsprechenden Gerätes vereinfachen. Es entfällt dann der Totraum zwischen Loch in der Arbeitsplatte (5) und dem Fenster (6) für den Laserstrahl.

Es ist nicht unbedingt notwendig, die Reaktantgas-Ionen vor der Vermischung mit dem Gasstrom, der die Probenmoleküle enthält, zu erzeugen. Es kann auch der Gasstrom mit Luft, Wasserdampf, Reaktantgas, Matrix-Zersetzungspprodukten und Analytmolekülen nach ihrer Mischung im Kanal (9) ionisiert werden, beispielsweise durch eine Wandbelegung mit Ni^{63} .

Die Trägerplatte (7) kann in ihrer Bewegungsvorrichtung (nicht gezeigt) in zwei Richtungen auf der Arbeitsplatte (5) verschoben werden. Die Verschiebung wird durch einen Rechner gesteuert und erlaubt es, die Belegung der Trägerplatte mit Substanzen zweidimensional zu erfassen. Es können damit Platten mit zweidimensional aufgetrennten Substanzen aus zweidimensionaler Elektrophorese abgetastet und nach der Verteilung von Proteinen oder anderer Untersuchungssubstanzen untersucht werden. Insbesondere können Blot-Membranen, die nicht aus einfacher Zellulose, sondern aus Schießbaumwolle gefertigt sind, nach üblicher Beladung mit den zweidimensional getrennten Substanzen direkt auf den Probenträger aufgebracht und für dieses Verfahren benutzt werden.

Die Ionen können in der Eingangskapillare (11) gegen eine Hochspannung angepumpt werden wobei aber eine untere Abschneideschwelle für leichte Ionen besteht, die für das Ausfiltern von Reaktantgasionen benutzt werden kann. Beispielsweise hat Stickstoff in einer 16 Zentimeter langen Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0,4 Millimetern eine Geschwindigkeit von 128 Metern pro Sekunde. Legt man über ein Teilstück d

Kapillare ein elektrisches Gegenfeld von 2000 Volt pro Zentimeter, so bewegen sich Ionen mit einer Masse von 110 atomic Masseneinheiten ebenfalls mit 128 Metern pro Sekunde in Gegenrichtung durch den Stickstoff, sie werden also vom Gas nicht mehr rückwärts transportiert. Die Ionen von Xylool werden also nicht in das Vakuum des Massenspektrometers gebracht. Ionen der Masse 1000 atomic Masseneinheiten haben jedoch nur eine Mobilitätsgeschwindigkeit von rund 30 Metern pro Sekunde, sie werden daher leicht vom strömenden Gas transportiert.

Durch Injektion thermischer Elektronen in den Gasstrom kann der Prozeß des Elektroneneinfangs gestartet werden. Diese können wiederum leicht mit Hilfe eines Beta-Strahlers in ein sauberes Gas injiziert werden, wobei sich die anfängliche kinetische Energie sehr schnell thermalisiert. Der Prozeß des Elektroneneinfangs findet am besten nach Mischung mit den Probenmolekülen statt, da die Elektronen sehr schnell entweichen.

Es können durch die Elektronen aber auch in bekannter Weise zunächst negative Reaktantgas-Ionen erzeugt werden, wenn ein Reaktantgas hoher Elektronenaffinität verwendet wird. Für die Ionisierung mit negativen Ionen bei Atmosphärendruck wird manchmal die Abkürzung APNCI verwendet. Diese Art der Ionisierung ist besonders für Nukleotide wichtig.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Ionisierung schwerer Analytmoleküle, die sich auf einem festen Probenträger in einer Gasumgebung bei Atmosphärendruck befinden, dadurch gekennzeichnet,

daß sich auf dem festen Probenträger außer den Analytmolekülen eine zersetzbare Matrixsubstanz befindet,
daß diese durch Licht aus einem Laser zur Zersetzung gebracht wird, wobei die Zersetzungsprodukte die Analytmoleküle in die Gasumgebung transportieren,
und daß die Analytmoleküle in an sich bekannter Weise durch Ionisierung bei Atmosphärendruck (API) ionisiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Explosivstoffe als Matrixsubstanz verwendet werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Explosivstoffe mit anderen Stoffen vermengt sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Matrixmaterial als dünne Lackschicht auf den festen Probenträger aufgebracht ist.

5. Verfahren nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytmoleküle mit dem Matrixmaterial innig vermengt sind.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Analytmoleküle auf die Oberfläche der Lackschicht aus Matrixmaterial aufgebracht sind.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das Gas vor dem Probenträger strömt und die Analytmoleküle transportiert.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Reaktantgasionen für die chemische Ionisierung im strömenden Gas befinden,

bevor dieses den Probenträger erreicht.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Reaktantgasionen in einem zweiten Gasstrom befinden, der sich mit dem vom Probenträger herkommenden Gasstrom vermischt. 5

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die sich bildenden Analytionen in dem Gasstrom einem Massenspektrometer zugeführt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktantgasionen vor Erreichen des Massenspektrometers ausgefiltert werden. 10

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausbeute an großen Ionen der Untersuchungssubstanz dadurch erhöht wird, daß ein Teil der Gasführung zum Massenspektrometer durch ein axiales elektrisches Feld als Ionendriftstrecke ausgebildet ist. 15

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

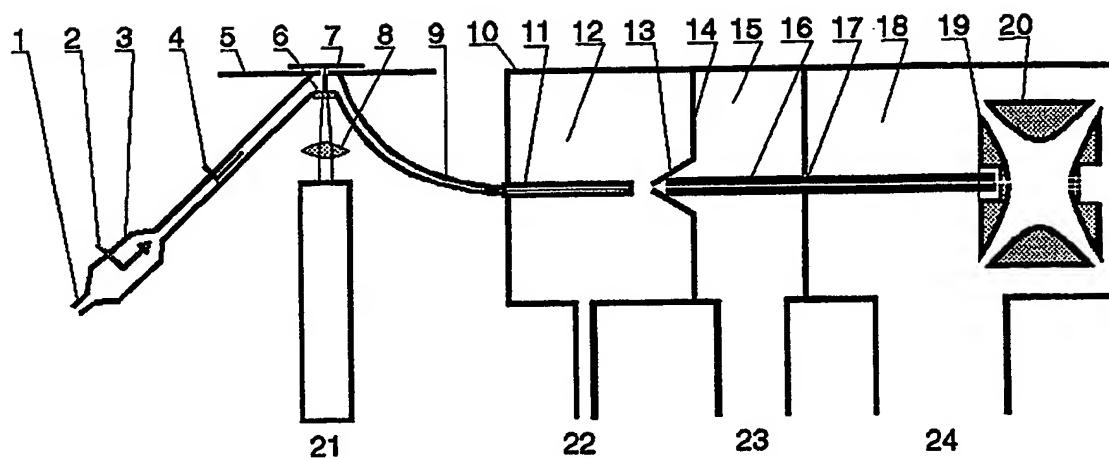
50

55

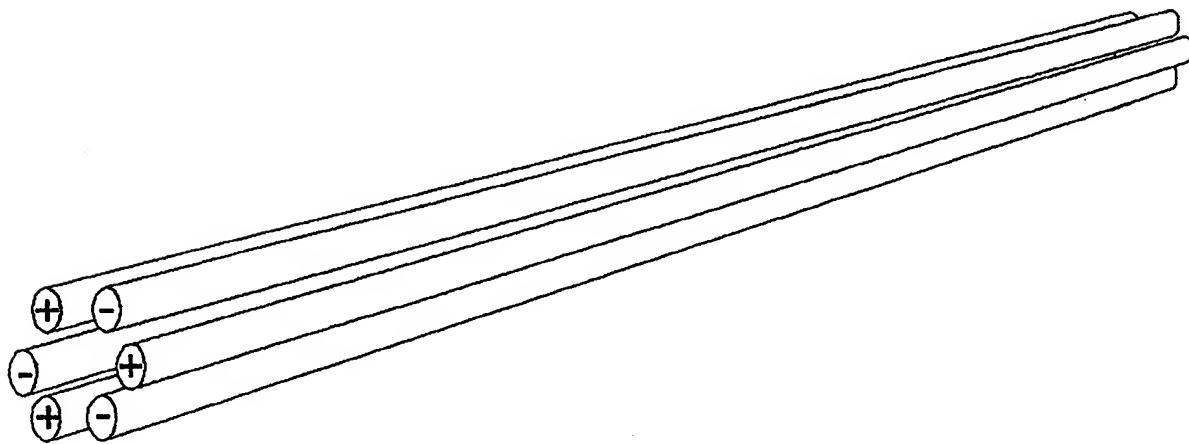
60

65

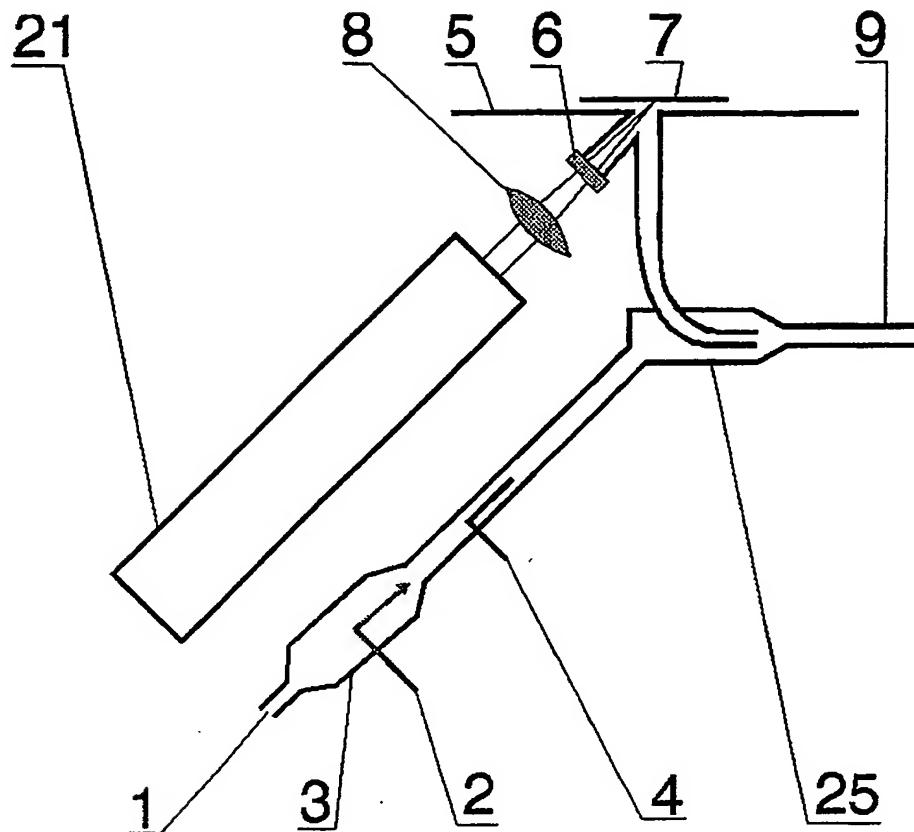
- L e r s i t e -



Figur 1



Figur 2



Figur 3